

果実の抗酸化活性に関する基礎的研究

Study on the Antioxidative Activity in Fruits

岩 渕 絵里子

Eriko IWABUCHI

Oxygen is a substance indispensable in order to live. But recently, active oxygen generated from oxygen has been a problem, because it is clear that a number of disease and senescence is caused by active oxygen. In order to identify lifestyle choices to eliminate these substances, antioxidative substances are required and it may be necessary to take in polyphenol and vitamins with antioxidative activity.

The citrus fruit contains numerous antioxidative substances, such as hesperidin (vitaminP) and other polyphenol, vitaminC. In this report, the relation between antioxidative activity and quantitative of total polyphenol in citrus fruit was compared and examined. Antioxidative activity was measured by ferric thiocyanate method and quantitative of total polyphenol was measured by Folin-Denis method.

From this experiment result, the citrus fruit would be expected as functional foods.

Key words: Active oxgen : 活性酸素
Antioxidative activity : 抗酸化活性
Antioxidative substance : 抗酸化物質
Hesperidin : ヘスペリジン
Citrus fruit : 柑橘類

1. はじめに

私たちをはじめ多くの生物の生命の営みに欠くことのできない物質に酸素 (oxygen) がある。大気中に約21%含まれており、非常に重要な物質であるが、近年この酸素から生成される活性酸素 (active oxygen) が問題になってきている。そして、活性酸素によって、さまざまな疾病や老化現象が引き起こされることが明らかになり、多くの研究が行われている。最近では、活性酸素は、酸素が還元される時に生じるスーパーオキシドラジカル (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、そしてヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) といった反応性の高い分子と光照射などで励起されてできる一重項酸素分子とを併せて、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) または、酸素ラジカル (oxygen radical) とも呼ばれるようになった。

生体で発生した活性酸素は、通常自然に消去されるか、または体内の酵素や摂取した食品中の抗酸化物質 (antioxidative substances) などによって消去される。しかし、活性酸素は、ストレスや光増感過程などの環境によって過剰に生成され、ほかの化合物との反応により、DNA 損傷や動脈硬化などを引き起こす物質に変化する。そのため、近年活性酸素を消去する性質のある抗酸化物質、またはスカベンジャー (活性酸素除去物質) が注目され、これらの物質を含む食品の研究が進んでいる。さらに、最近では食品の栄養性 (一次機能) や嗜好性 (二次機能) だけではなく、健康維持や疾病予防などの食品の予防的役割 (三次機能) も期待されるようになってきた。

植物には、さまざまなフラボノイド配糖体が存在し、抗酸化物質としての働きをする。その中でも、オレンジなどの柑橘類の果皮に含まれるヘスペリジン (hesperidin) は、毛細血管の抵抗性を増強し、血管透過性亢進を抑制することが古くから知られ、ビタミンPと呼ばれてきた¹⁾。しかし、欠乏症が明確にされていないことなどから栄養素には入っていなかったが、最近では、抗酸化作用をはじめ血圧降下作用、抗アレルギー作用などの多くの生理活性をもつことが報告され、機能性のある食品成分として注目されるようになってきている²⁾。

本実験では、一般的な果実を試料とし、ロダン

鉄法 (Ferric thiocyanate method) による抗酸化活性の測定、Folin-Denis 法等³⁾ による総ポリフェノールの定量を行い、果実の種類による抗酸化活性とポリフェノールの量的関係を比較、検討したので報告する。

2. 実験

(1) 試料

今回の実験には、一般に市販されている柑橘類の中から、みかん、オレンジ、そしてグレープフルーツ (ホワイト、ルビー) を各2個ずつ実験に供した (表1)。また、比較のためポリフェノール含量が高いとされているりんご、ぶどうについても実験を行った。

表1 実験試料

試料	品種	産地
りんご	ふじ	青森産
ぶどう	巨峰	山梨産
オレンジ	バレンシア	カリフォルニア産
みかん	ハウス	佐賀産
グレープフルーツ	ホワイト	南アフリカ産
グレープフルーツ	ルビー	南アフリカ産

(2) 試薬

1) ロダン鉄法 (Ferric thiocyanate method)

エタノール (Ethanol)、ツィーン80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate)、リノール酸 (Linoleic acid)、塩化第1鉄 (Iron(II) chloride tetrahydrate)、チオシアン酸アンモニウム (Ammonium thiocyanate)、リン酸水素二ナトリウム (Disodium hydrogenphosphate 12-water)、リン酸二水素ナトリウム (Sodium dihydrogenphosphate dihydrate)、塩酸 (Hydrochloric acid) を用いた。標準品として、(+)-カテキン ((+)-Catechin) を用いた。

2) 総ポリフェノール量の定量

ジメチルスルホキシド (DMSO)、フェノール試薬 (Folin-Ciocalteu)、炭酸ナトリウム (Sodium carbonate)、(+)-カテキン ((+)-Catechin) を用いた。

(3) ロダン鉄法による抗酸化活性の測定

1) 試料溶液の調製

各試料を約1g精秤し、99.5%エタノール (99ml) で抽出、定容して0.1%試料溶液とした。各0.1%試料エタノール溶液2mlを共栓付小試験

管にとり、これに2.5%リノール酸エタノール溶液 2 ml、0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 4 ml、蒸留水 2 ml、ツィーン80を2滴加え、ミキサーを用いてよく攪拌した。最終的な試料濃度は0.02%とし、これを50°Cの恒温器中に静置した。また、試料を含まない99.5%エタノールを加えたものを対照 (Control) とした。

2) 抗酸化活性の測定

経時的に各調製試料溶液から0.1mlを試験管に採取し、75%エタノール溶液9.7ml、30%チオシアン酸アンモニウム溶液0.1mlを加え、ミキサーを用いてよく攪拌した。これに塩化第1鉄を3.5%塩酸で溶解した0.02 M塩化第1鉄塩酸溶液0.1mlを加え再び攪拌し、正確に3分後に500nmの吸光度を分光光度計によって測定した。この操作を24時間ごとに120時間後まで行った。同様の操作をControlについても行った。各試料について2反復測定して得られた値の平均値を結果とした。

(4) 総ポリフェノール量の定量 (Folin-Denis method)

1) 試料溶液の調製

各試料を約5g精秤し、ジメチルスルホキシドで15分間室温抽出後、50mlに定容、濾過して試料溶液とした。

2) 総ポリフェノール量の定量

各試料調製溶液50μlに蒸留水4ml、5倍希釈したフェノール試薬1ml、10%炭酸ナトリウム溶液1mlを加えミキサーでよく攪拌し、暗所で1時間反応後、760nmの吸光度を分光光度計によって測定した。予め作成した(+)-カテキンを用いた検量線から総ポリフェノール量を求めた。各試料について2反復測定して得られた値の平均値を結果とした。

3. 結果と考察

異なる柑橘類のリノール酸に対する抗酸化活性の測定結果を図1に示した。72時間後まではグレープフルーツ (ルビー) が強い抗酸化活性を示した。

また、各柑橘類の総ポリフェノール量の定量結果を図3に示した。図1で最も強い抗酸化活性を示したグレープフルーツ (ルビー) の総ポリフェノール量が少なく、抗酸化活性の強さと総ポリフェノール量の間に関連は認められなかった。

すべての柑橘類で、総ポリフェノール含量の高いりんご、ぶどうよりも強い抗酸化活性を示した (図2、3)。

柑橘類の抗酸化物質として、ポリフェノール類のほかにビタミンCなどの成分の存在が考えら

図1 柑橘類の抗酸化活性の変化

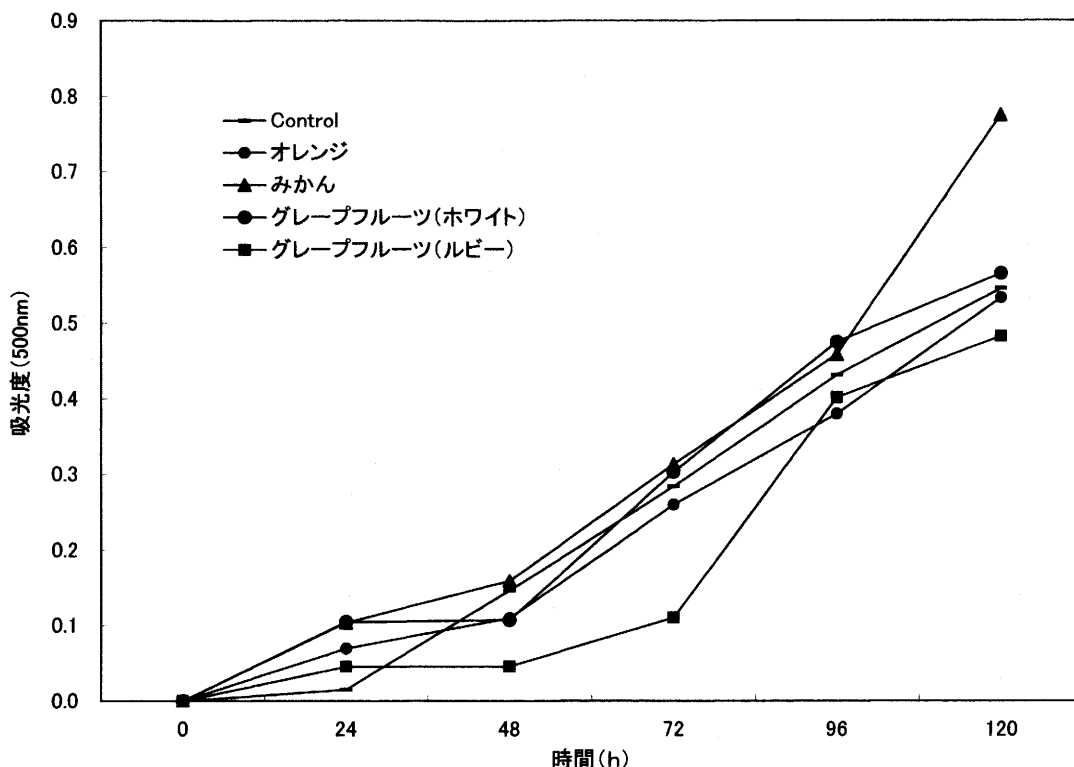


図2 果実の抗酸化活性の変化

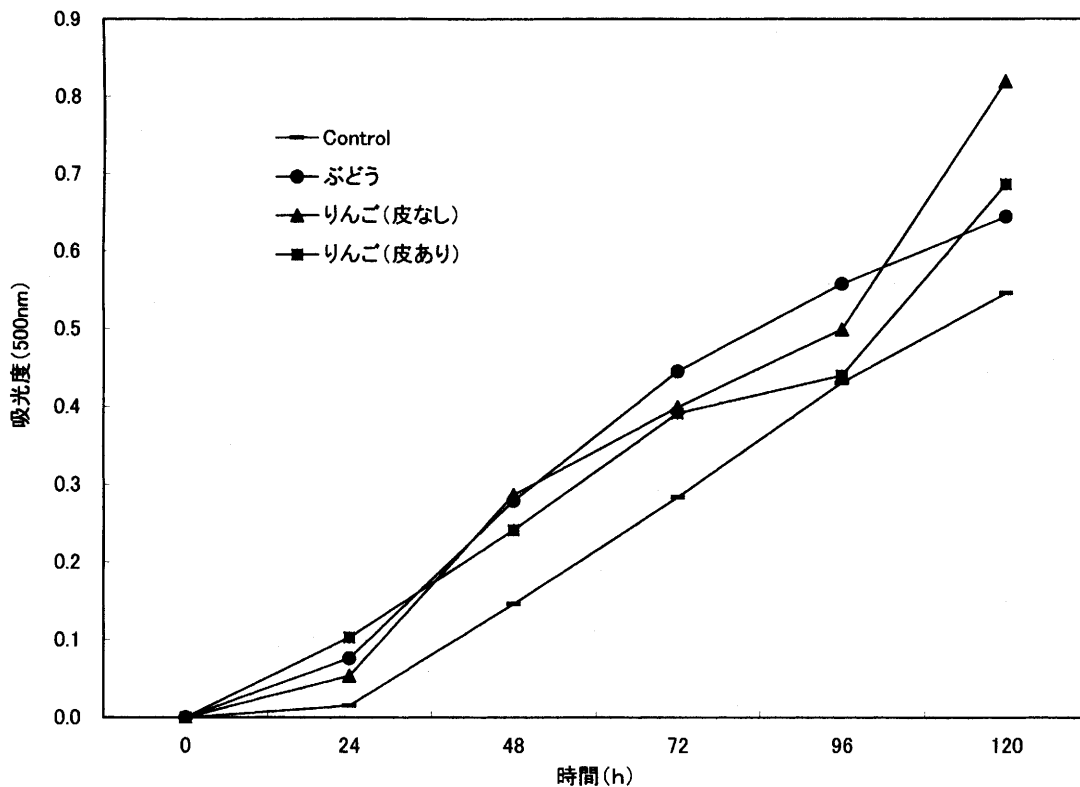
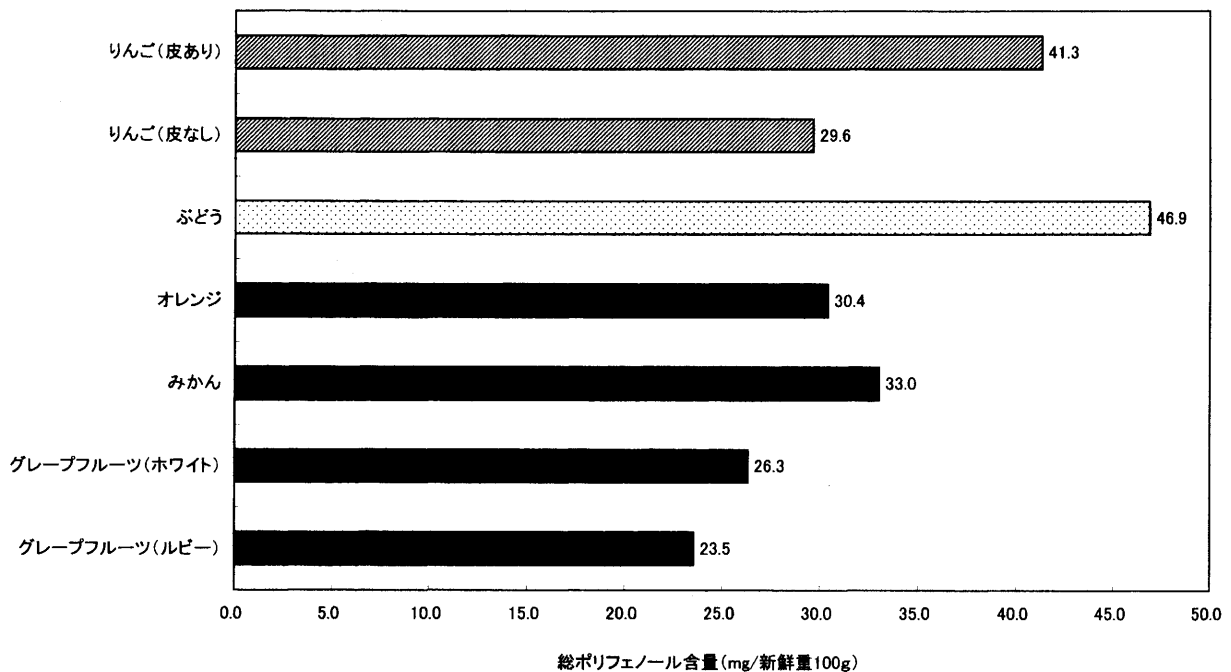


図3 果実の総ポリフェノール含量



れる。アスコルビン酸は、光に弱く、さらに酸化されやすい性質であることが、オレンジなどの抗酸化活性が予想より弱かった原因の1つと考えることができる。さらに、ヘスペリジンは、糖転移することにより水溶性が1万倍以上になる¹⁾こ

とから、各柑橘類の糖度などの影響も考える必要があるかもしれない。

4. おわりに

各柑橘類に含まれるヘスペリジンの定量を行い、アスコルビン酸含量や糖度との関係を検討し、抗酸化活性の測定を行っていくことが、今後必要であると考えられる。また、柑橘類は、手頃な値段で、簡単に摂食可能な食品であることから、三次機能性のある食品として今後期待できるだろう。

謝 辞

今回の実験を進めるにあたって、試料調製等でご協力いただいた本学の東郁美さん、氏家志乃さんに謝意を表します。

引用文献

- 1) 三鼓仁志、長尾有里子：糖転移ビタミン類の機能と最近の研究動向、Fragrance journal、5、(2002)
- 2) 三鼓仁志：糖転移ビタミンP類の研究開発、ハイテクインフォメーション、135、(2002)
- 3) 鈴木誠：Folin-Denisによる総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討、日本食品科学工学会誌、49(7)、507、(2002)

参考文献

- 1) Adrian A, Franke, Laurie J, Custer, Christi Arakaki, Suzanne P, Murphy : Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii, Journal of Food Composition and Analysis, 17, 1-35, (2004)
- 2) J.A.Del Rio, M.D.Fuster, P.Gomez, I.Porras, A.Garcia-Lidon, A.Ortuno : Citrus limon : a source of flavonoids of pharmaceutical interest, Food Chemistry, 84, 457 - 461, (2004)
- 3) 学会センター関西：食品の抗酸化機能、(2002)
- 4) Jose A. Larrauri, Pilar Ruperez, Laura Bravo & Fulgencio Saura-Calixto : High dietary fibre powders from orange and

lime peels : associated polyphenols and antioxidant capacity, Food Research International, 29(8), 757-762, (1996)

- 5) 五十嵐脩、康東天、鈴木俊英、竹重公一郎、寺尾純二、福澤健治、水上茂樹、宮澤陽夫、吉川敏一：活性酸素と栄養、(1995)